

maizaal@yahoo.com.br

Palavras-chave: Quitinase, Vassoura-de-bruxa, *Crinipellis pernicios*Lopes, MA<sup>1</sup>; Gomes, DS<sup>1-5</sup>; Oliveira, GSA<sup>1-5</sup>; Santos, SC<sup>1</sup>; Britto, DS<sup>1</sup>; Pires, ABL<sup>1</sup>; Pirovani, CP<sup>1</sup>; Gesteira, AS<sup>1</sup>; Gramacho, KP<sup>3</sup>; Góes-Neto, A<sup>4</sup>; Cascardo, JCM<sup>1</sup>; Micheli, F<sup>1-2</sup><sup>1</sup>DCB-UESC, Laboratório de Genômica e Expressão Gênica; <sup>2</sup>CIRAD-CP, UMR PIA, Montpellier, France; <sup>3</sup>CEPLAC/CEPEC - Laboratório de Fitopatologia; <sup>4</sup>DCBio-UEFS-Laboratório de Pesquisa em Microbiologia; <sup>5</sup>Bolsistas PROIC-UESC.

## Caracterização molecular de quitinase de *Crinipellis pernicios*

As quitinases catalisam a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas  $\beta$ 1-4 presentes nos biopolímeros de N-acetilglicosamina principalmente em quitina. As quitinases estão presentes em vários organismos, e dependendo do organismo elas têm diferentes funções. As quitinases bacterianas desempenham função nutricional liberando carbono e nitrogênio para as células a partir da hidrólise de quitina. Em plantas estas enzimas desempenham principalmente um papel na defesa contra ataques de patógenos. A atividade quitinolítica também é encontrada em vírus, artrópodes, nemátodos e outros animais mesmo naqueles que não possuem quitina na sua composição. Em fungos, as quitinases estão envolvidas em uma variedade de funções tais como digestão da parede celular, germinação de esporos, crescimento e autólise da hifa, diferenciação em esporos e assimilação de quitina e micoparasitismo. A quitina é o principal constituinte da parede celular da maioria dos fungos e por isso a interferência no metabolismo de quitina é uma importante estratégia utilizada para controle de inúmeros fungos fitopatogênicos como o *Crinipellis pernicios*. Com o objetivo de caracterizar bioquimicamente e funcionalmente quitinases de *C. pernicios*, seqüências de clones genômicos de quitinase disponíveis no banco de dados do fungo foram analisadas utilizando-se programas computacionais. As análises das seqüências encontradas no banco de dados do genoma do *C. pernicios* permitiram a montagem de dois contigs. Dois fragmentos foram amplificados por PCR utilizando primers específicos para cada um deles, gerando dois fragmentos (fragmento 1 e fragmento 2). As análises dos contigs permitiram identificar domínios conservados além de um sítio ativo que são característicos de quitinases pertencentes à família 18 das glicosil hidrolases. O fragmento 2 foi utilizado como sonda para a determinação do número de cópias do gene, revelando a existência de apenas uma cópia de quitinase no genoma *C. pernicios*. O fragmento 1 foi introduzido em vetor de expressão de proteína em bactéria, sob o controle do promotor da T7 RNA polimerase, com o operador lac, cuja expressão é induzida por IPTG. A proteína foi expressa com sucesso e esta sendo purificada para uso posterior em ensaio de atividade. Também, o gene 1 teve sua expressão analisada a nível de transcrição por RT-PCR, partindo de RNA total extraído do fungo cultivado em sistema artificial (bolachas) em diferentes fases de desenvolvimento. O RT-PCR foi normalizado a partir da amplificação do gene de actina que é constitutivamente expresso. A análise da expressão gênica aponta para uma maior expressão do gene no basidioma. ■

Apoio financeiro: FAPESB, CNPq e CIRAD.